UNTERSUCHUNGEN ÜBER DIE EIGNUNG DES ATP-, ADP- UND AMP-NACHWEISES MIT DER BIOLUMINESZENZMETHODE ZUR BEURTEILUNG VON TIEFGEFRIER-KONSERVIERUNGSVERFAHREN FÜR BULLENSPERMIEN

Gabriel Vélez Cuevas

1982

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546825_0010

Aus der Gynäkologischen und Ambulatorischen Tierklinik
der Tierärztlichen Fakultät der Universität München
Lehrstuhl: Professor Dr. W. Leidl

UNTERSUCHUNGEN ÜBER DIE EIGNUNG DES ATP-, ADP- und AMP-NACHWEISES MIT DER BIOLUMINESZENZMETHODE ZUR BEURTEILUNG VON TIEFGEFRIERKONSERVIERUNGSVERFAHREN FÜR BULLENSPERMIEN

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

von
Gabriel Vélez Cuevas
aus
Fontibon/Kolumbien

München 1982

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Universität München

Dekan: Prof.Dr.G.Terplan

Referent: Prof.Dr.W.Leidl

Korreferent: Prof.Dr.W.Bollwahn

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Tag der Promotion: 26. Februar 1982

DISSERTATIONS - UND FOTODRUCK FRANK GmbH
8000 München 2, Gabelsbergerstraße 15, Tel. 2809090

Inhaltsverzeichnis

		Seite
1.	Einleitung	4
2.	Literatur	5
2.1.	Adenosinnucleotide	5
2.1.1.	Funktionen der Adenosinnucleotide im Stoffwechsel der Spermien	5
2.1.2.	Adenosinnucleotide als Parameter für die Stoffwechselaktivität von Spermaproben beim Rind	6
2.1.3.	Adenosinnucleotide als Parameter in der Spermatiefgefrierkonservierung	6
2.1.4.	"Adenylate energy charge" (AEC)	7
2.2.	Tiefgefrierkonservierung von Rindersperma	8
2.2.1.	Adaptation der Spermien	9
2.2.2.	Besamungsdosis bzw. Spermiendichte	10
3.	Eigene Untersuchungen	13
3.1.	Material und Methoden	13
3.1.1.	Untersuchungsmaterial	13

		Seite
3.1.2.	Tiefgefrierkonservierung der Spermien	14
3.1.2.1.	Abkühlung der Samenproben auf Zimmertemperatur	14
3.1.2.2.	Zugabe der Verdünner	15
3.1.2.3.	Abfüllen des verdünnten Spermas in Pailletten	17
3.1.2.4.	Abkühlung auf +5°C und Adaptationszeit	17
3.1.2.5.	Tiefgefrier-Schnellmethode nach JONDET	19
3.1.2.6.	Lagerung und Auftauen	19
3.1.3.	Parameter der Untersuchung	21
3.1.3.1.	Bestimmung der Vorwärtsbewegung	21
3.1.3.2.	Adenosinnucleotidmessung mit dem Biolumineszenzverfahren	22
3.1.3.2.1.	Vorbereitung einer Spermaprobe	22
3.1.3.2.2.	Meßgerät und Meßreagenzien	22
3.1.3.2.3.	ATP-Bestimmung	23
3.1.3.2.4.	ADP-Bestimmung	24

		Seite
3.1.3.2.5.	AMP-Bestimmung	24
3.1.4.	Versuchsaufbau	26
3.2.	Ergebnisse	28
3.2.1.	Vorwärtsbewegung der Spermien	28
3.2.2.	ATP-Gehalt	31
3.2.3.	Vergleich der Vorwärtsbewegung mit dem ATP-Gehalt	34
3.2.4.	ADP-Gehalt	37
3.2.5.	Verhältnis von ATP- zu ADP-Gehalt	40
3.2.6.	AMP-Gehalt	43
3.2.7.	Verhältnis von ATP- zu AMP-Gehalt	43
3.2.8.	"Adenylate energy charge" (AEC)	43
4.	Diskussion	48
5.	Zusammenfassung	55
6.	Summary	56
7.	Literaturverzeichnis	57
	Lebenslauf	63

1. EINLEITUNG

Zur Bestimmung der Stoffwechselaktivität einer Spermaprobe standen bisher nur einerseits die subjektive Motilitätsschätzung sowie andererseits sehr aufwendige Labormethoden, wie z.B. die Messung des Fruktoseverbrauches, des Sauerstoffverbrauches oder die Videomikrographie (KATZ und OVERSTREET, 1981) zur Verfügung. Eine Verbesserung dieser Situation verspricht die Bestimmung der ATP-, ADP- und AMP-Gehalte im Sperma mit Hilfe einer Biolumineszenz-Reaktion. Die Adenosinnucleotide scheinen als objektiv meßbare Parameter für die Stoffwechselaktivität und damit auch für die Motilität von Spermien geeignet zu sein (BRACKETT und WILLIAMS, 1967; BROOKS, 1970a, b, 1971; PRINZEN, 1977; FOULKES und MacDONALD, 1979; PFETSCH, 1979; LEIDL, 1980; KÄHN, 1981a, b). Nachdem methodische Probleme weitgehend geklärt werden konnten, erschien es angebracht, die Einsatzmöglichkeiten dieser Bestimmung für praktische Fragestellungen zu überprüfen. Als Modell wurde dazu die Tiefgefrierkonservierung von Bullensperma gewählt. Gerade die Optimierung des Tiefgefrierkonservierungsverfahrens durch Modifizierung von Einzelschritten ist an einen objektiv, aber dennoch leicht erfaßbaren Parameter gebunden, der auch geringe Unterschiede erkennbar macht.

2. LITERATUR

2.1. Adenosinnucleotide

2.1.1. Funktionen der Adenosinnucleotide im Stoffwechsel der Spermien

Die Adenosinnucleotide nehmen im Stoffwechsel der Spermien eine zentrale Rolle ein. Die Phosphorylierung von AMP oder ADP zum energiereichen ATP findet in der Mitochondrienhülle des Mittelstückes statt. Verbraucht - und bei Überschuß auch gelagert - wird das ATP entlang des gesamten Spermienschwanzes (NEVO und RIKMENSPOEL, 1969).

Die zur ATP-Resynthese benötigte Energie wird durch Fruktolyse und Respiration gewonnen. Steht kein Sauerstoff zur Verfügung, so erfolgt der Abbau der Substrate durch Fruktolyse. Dabei werden pro Mol Fruktose 2 Mol ATP und 2 Mol Milchsäure erzeugt (WHITE et al., 1954). Unter aeroben Bedingungen dagegen findet sowohl Fruktolyse als auch endogene und exogene Respiration statt (SALISBURY und VAN DEMARK, 1961). Bei der Respiration entstehen pro Mol Fruktose 38 Mol ATP.

Verbraucht wird die im ATP gespeicherte Energie hauptsächlich durch die Bewegung des Spermienschwanzes. Der Energiebedarf ist in allen Teilen des Spermienschwanzes etwa gleich hoch. Der Transport des ATP vom Mittelstück zum Schwanz des Spermiums erfolgt durch Diffusion (NEVO und RIKMENSPOEL, 1969). Die ATP-ase Dynein katalysiert die Dephosphorylierung des Adenosintriphosphates zu ADP und einem Phosphatanteil bzw. AMP und einer weiteren Phosphatgruppe (GIBBONS und GIBBONS, 1979). Die dabei freiwerdende chemische Energie wird durch kontraktile Elemente im Spermienschwanz in mechanische Energie verwandelt (MACHIN, 1958).

2.1.2. Adenosinnucleotide als Parameter für die Stoffwechselaktivität von Spermaproben beim Rind.

Die Messung der Adenosinnucleotide ATP, ADP und AMP im Sperma wurde erstmals im Jahre 1961 von NEWTON und ROTHSCHILD durchgeführt. Seitdem untersuchten verschiedene Autoren mit unterschiedlichen Methoden die ATP-, ADP- und AMP-Gehalte in Bullenejakulaten. Die dabei ermittelten Werte liegen für ATP zwischen 5,0 und 76,5 nmol/10^8 Spermien; für ADP zwischen 4,1 und 12,0 nmol/10^8 Spermien und für AMP zwischen 2,0 und 13,5 nmol/10^8 Spermien (BROOKS, 1970b; HOSKINS, 1972; GARBERS et al., 1973; PFETSCH, 1979; KÄHN, 1981a, b). Der ATP-Gehalt von Spermaproben weist nach diesen Untersuchungen eine gute Korrelation zur Motilität und damit auch zur Stoffwechselaktivität auf. Eine schnelle und relativ einfache Bestimmung des Adenosintriphosphates ist mit Hilfe des Biolumineszenzverfahrens möglich. Die methodische Schwierigkeit, daß im Seminalplasma befindliche ATP-spaltende Enzyme den ATP-Gehalt während der Messung verändern (PFETSCH, 1979), konnte durch die von KÄHN (1981a) beschriebene Hitzedenaturierung der zu untersuchenden Spermaproben überwunden werden. Dazu werden jeweils 20 µl einer Spermaprobe für eine Minute im Wasserbad auf +100°C erhitzt und dadurch die Adenosinnucleotid-abbauenden Enzyme inaktiviert. Die danach konstante Lichtemission während der ATP-Messung war die Voraussetzung für die gleichzeitige ADP- und AMP-Bestimmung in Spermaproben.

2.1.3. Adenosinnucleotide als Parameter in der Spermatiefgefrierkonservierung

Die Bestimmung des ATP-Gehaltes zur Beurteilung von Spermaproben nach der Tiefgefrierkonservierung wurde erstmals von PRINZEN (1977) durchgeführt. Dabei konnte eine gute Übereinstimmung zwischen der geschätzten Vorwärtsbeweglichkeit und dem ATP-Gehalt

von Spermaproben nach Tiefgefrierkonservierung gefunden werden. Auch der Einfluß unterschiedlicher Auftauverfahren war damit nachweisbar. Diese prinzipielle Übereinstimmung zwischen Motilität und ATP-Gehalt in Tiefgefrierspermaproben wurde auch in den Untersuchungen von FOULKES und MacDONALD (1979) bestätigt. In diesen Untersuchungen konnte ferner gezeigt werden, daß die ATP-Werte in Tiefgefrierspermaproben gegenüber den Ausgangswerten im nativen Sperma stark abfallen. Damit könnte der ATP-Wert auch ein Parameter für die Schädigung der Spermien durch den Tiefgefrierprozeß sein.

KÄHN (1981a, b) und KÄHN et al. (-) verfolgten erstmals den ATP-Gehalt von Spermaproben während des Tiefgefriervorganges und stellten dabei fest, daß der ATP-Gehalt weitaus stärker abfiel als dies in der geschätzten Vorwärtsbeweglichkeit zum Ausdruck kam, wenn hier auch prinzipiell ein gleichsinniges Verhalten der beiden Parameter beobachtet wurde. Der ADP-Gehalt, der parallel zum ATP-Wert bestimmt wurde, zeigte dagegen im Verlauf des Tiefgefriervorganges bis nach der Adaptation einen leichten Anstieg und wies bei den aufgetauten Spermaproben einen deutlich erniedrigten Wert auf.

2.1.4. "Adenylate energy charge" (AEC)

Besser als die absoluten Mengen der einzelnen Adenosinnucleotide soll sich die Betrachtung ihres Verhältnisses zueinander als Kriterium für den Stoffwechselstatus einer Zelle eignen. Deswegen führten ATKINSON und WALTON (1967) den Begriff der "Adenylate energy charge" (AEC) ein. Dieser Wert steigt proportional mit dem Mol-Anteil von ATP zuzüglich des halben Mol-Anteiles von ADP und ist umgekehrt proportional der Summe der Mol-Anteile aller drei Adenosinnucleotide. Damit ergibt sich folgende Berechnungsformel:

$$AEC = \frac{ATP + 1/2\ ADP}{ATP + ADP + AMP}$$

Der AEC-Wert hat einen theoretisch möglichen Schwankungsbereich von 0 für den Fall, daß alle Adenosinnucleotide zu AMP abgebaut sind und 1 für den Fall, daß nur ATP vorhanden ist. Mit dem AEC-Wert kann die metabolisch verfügbare Energie, die im Adenylsäuresystem einer Zellpopulation gespeichert ist, erfaßt werden (HOLM-HANSEN und KARL, 1978).

Da Zellen unter physiologischen Bedingungen über Kontrollsysteme verfügen, die die Konzentrationen der Adenosinnucleotide innerhalb enger Grenzen aufrecht erhalten, sollten äußere Einflüsse auf eine Zellpopulation in der "Adenylate-energy-charge" reflektiert werden (HOLM-HANSEN und KARL, 1978).

In nativen Spermaproben von Bullen wurde ein AEC-Wert von 0,596 ermittelt (KÄHN, 1981a). Weitere Angaben für Bullensperma liegen nicht vor.

2.2. Tiefgefrierkonservierung von Rindersperma

Die Tiefgefrierkonservierung von Rindersperma wird heute überall routinemäßig in der künstlichen Besamung eingesetzt. Einen umfangreichen Oberblick über diese Art der Spermakonservierung gibt IRITANI (1980). Aus seiner Zusammenstellung geht hervor, daß Einzelschritte des Tiefgefrierverfahrens noch sehr unterschiedlich gehandhabt werden. Dies betrifft z.B. die Glyzerinkonzentration, den Zeitpunkt der Glyzerinzugabe, die Spermienkonzentration sowie die Adaptationszeit. Nach wie vor werden diese Modifizierungen, d.h. ihre Auswirkungen auf die betreffende Spermaprobe mit Hilfe der Schätzung der Vorwärtsbeweglichkeit der Spermien beurteilt.

In der folgenden Literaturübersicht soll nur auf die beiden Einzelschritte eingegangen werden, die auch Gegenstand der eigenen Versuche sind, nämlich die Adaptationszeit und die Spermienendkonzentration, also die Spermiendichte.

2.2.1. Adaptation der Spermien

Die Tiefgefrierkonservierung von Spermien ist nur mit Hilfe von Stoffen möglich, die die Samenzellen vor den durch das Einfrieren und Auftauen verursachten Schäden schützen. Dazu wird meist Glyzerin verwendet. Durch den Zusatz dieses Kryoprotektivums wird das die Spermien umgebende Milieu verändert und die Spermien brauchen eine gewisse Zeit, die sogenannte Adaptationszeit, um sich daran zu gewöhnen. Gleichzeitig dringt während dieser Zeit das Kryoprotektivum in die Zelle ein, um auch intrazellulär wirksam werden zu können (POLGE und ROWSON, 1952; O'DELL und HURST, 1956; HAYDN, 1968; JONDET, 1980).

Die Temperatur, bei der glyzerinhaltige Verdünner zugegeben werden, ist nach EIBL et al. (1964) und POLGE und JAKOBSEN (1959) ohne entscheidende Bedeutung.

Während der Adaptationszeit sollte das verdünnte Sperma bei Temperaturen zwischen 0 und +8°C aufbewahrt werden. In diesem Temperaturbereich wird die Motilität der Spermien unterdrückt und ihre Stoffwechselaktivität vermindert (EASLEY et al., 1942; HAYDN, 1968; BLACKSHAW et al., 1957). Dieser Zustand der reversibel verlangsamten Lebensvorgänge macht Adaptationszeiten von bis zu 24 Stunden möglich, ohne daß die Lebensfähigkeit der Spermien dadurch beeinträchtigt wird (JONDET, 1980).

Über die Dauer der optimalen Adaptationszeit gibt es verschiedene

Meinungen. Die Vorschläge reichen von einer Minute (JONDET 1972a, b) bis zu 24 Stunden (HOLT, 1953), wobei die meisten Autoren einen Zeitraum zwischen 6 und 18 Stunden bevorzugen (POLGE und JAKOBSON, 1959; LEIDL und ROSSE, 1956; IRITANI, 1980).

Eine reziproke Beziehung zwischen Abkühl- und Adaptationszeit stellten ENNEN et al. (1976) fest. Die höchste Motilität nach dem Auftauen wurde registriert, wenn die Proben entweder langsam, innerhalb von 4 Stunden abgekühlt wurden und dann 2 bis 4 Stunden Adaptationszeit hatten oder wenn sie schnell, innerhalb von 2 Stunden abgekühlt wurden, dafür aber 4 bis 10 Stunden Adaptationszeit hatten.

WIGGIN und ALMQUIST (1975a, b) kommen auf Grund ihrer Untersuchungen zu dem Schluß, daß auch zwischen Auftaugeschwindigkeit und Adaptationszeit eine Beziehung bestehen könnte. Je kürzer die Adaptationszeit war, desto schneller sollte ihrer Meinung nach das Sperma aufgetaut werden.

Ein individueller Einfluß einzelner Bullen geht aus dem Obersichtsreferat von IRITANI (1980) hervor. Er unterscheidet bei der Angabe der Adaptationszeit zwei Gruppen von Bullen. Für die Gruppe, deren Sperma schlechtere Tiefgefriereignung zeigt, empfiehlt er eine kurze Adaptationszeit von 2 bis 4 Stunden. Bei der Gruppe, deren Sperma gute Tiefgefriereignung zeigt, hält er eine 6- bis 8-stündige Adaptation für optimal.

2.2.2. Besamungsdosis bzw. Spermiendichte

Eine weitere Variable ist die Spermienkonzentration in den Tiefgefriersamenportionen und damit, in Verbindung mit dem Volumen der Samenportion, die absolute Anzahl von Spermien pro Besamungsdosis.

Die Bedeutung der Anzahl der Spermien pro Samenportion für den Erfolg bei der Tiefgefrierkonservierung war schon Gegenstand zahlreicher Untersuchungen. Dabei wurde in der Regel nur auf das Besamungsergebnis, gemessen an der Non return-Rate, eingegangen. Unmittelbare Auswirkungen der unterschiedlichen Spermienkonzentrationen auf die Oberlebensrate der Spermien beim Einfrieren und Auftauen wurden dabei nicht untersucht. Beispiele sehr extremer Unterschiede in Volumen und Spermiendichte der Besamungsdosis sind in Tabelle 1 zusammengestellt.

Tab. 1: Einfluß des Volumens und der Spermiendichte auf die Non return-Rate (N.R.R.) bei Kühen, die mit tiefgefrierkonserviertem Sperma besamt wurden

Besamungsdosis			N.R.R.	Autoren
Volumen ml	Dichte pro mm^3	Spermien insgesamt x 10^6	%	
1,0	20 000	20	71,7	PICKETT et al. (1964)
1,0	30 000	30	72,2	
1,0	ca.75 000*	ca.75**	72,8	HAHN (1966)
0,25	20 000	5	59,1	FOULKES und STEWART (1977)
0,25	80 000	20	66,7	
0,20	2 900	0,58	51,8	JONDET (1980)
0,20	100 000	20	69,5	

* 71 000 - 75 000 ** 71 - 75

3. EIGENE UNTERSUCHUNGEN

3.1. Material und Methoden

3.1.1. Untersuchungsmaterial

Das Sperma wurde von drei Bullen der Rasse Deutsches Fleckvieh (Alter 24 bis 28 Monate) gewonnen. Die Tiere waren klinisch gesund; Geschlechtsorgane und -funktionen waren ohne Besonderheiten.

Die Spermagewinnung erfolgte mit Hilfe einer künstlichen Scheide. Als Deckpartner dienten andere Bullen. Das Ejakulat wurde in einem doppelwandigen Glas aufgefangen. Zwischen den Wänden des Glases war Wasser mit einer Temperatur von +27°C eingefüllt, um eine zu rasche Abkühlung des Spermas und damit die Gefahr eines Kälteschocks zu vermeiden.

Unmittelbar nach der Spermagewinnung erfolgte die Beurteilung der Ejakulate nach folgenden Kriterien:

I. Makroskopisch
   1. Volumen (ml)
   2. Farbe
   3. Konsistenz
   4. Wolkenbildung

II. Mikroskopisch
   1. Motilitätsschätzung
      - Massenbewegung
      - Einzelbewegung:
        Prozentualer Anteil vorwärtsbeweglicher Spermien (V.%, siehe 3.1.3.1.)

2. Dichtebestimmung (Zählkammer nach Türk; Spermienzahl/mm³)
3. Lebend-Tot-Färbung (Bromphenolblau; ausgewertet wurden 300 Spermien/Probe)

Für die Untersuchungen wurden nur Ejakulate verwendet, bei denen die Werte aller oben aufgeführten Merkmale im physiologischen Bereich lagen.

3.1.2. Tiefgefrierkonservierung der Spermien

Der gesamte Tiefgefrierprozeß setzte sich aus mehreren aufeinanderfolgenden Arbeitsgängen zusammen. Zunächst wurde das Ejakulat auf Zimmertemperatur (ca. +22°C) abgekühlt, dann wurden die Verdünner zugesetzt und anschließend das verdünnte Sperma in Pailletten abgefüllt. Es folgten die Abkühlung auf +5°C, die Adaptation und schließlich das eigentliche Tiefgefrieren der Spermaproben. Die einzelnen Arbeitsschritte werden im folgenden näher beschrieben.

3.1.2.1. Abkühlung der Samenproben auf Zimmertemperatur

Zunächst wurde von jedem gerade gewonnenen Ejakulat so viel entfernt, daß noch 3 ml Sperma im Auffangglas verblieben. Unmittelbar danach wurden 3 ml des Verdünners I (siehe 3.1.2.2.), der auf +37°C erwärmt worden war, zugegeben.

Zur Abkühlung des vorverdünnten Spermas auf Zimmertemperatur (ca. +22°C), wurde das doppelwandige Spermaauffangglas 10 Minuten in ein Wasserbad von +22°C gestellt. Der Temperaturabfall wurde mit

einem Thermofühler (Fa. VARIAN Associates, Model G-11A Strip-Chart Recorder) gemessen (Abb. 1).

3.1.2.2. Zugabe der Verdünner

Bei allen Versuchen wurde der Tris-(hydroxymethyl)-Aminomethan-Verdünner nach FOOTE et al. (1960) verwendet.

Die Stammlösung des Verdünners setzt sich zusammen aus:

6,056	g	Trishydroxymethylaminomethan
3,4	g	Zitronensäure
2,5	g	Fruktose
176,0	ml	Aqua dest.

Diese Lösung wurde bis auf +92°C erhitzt und danach auf Raumtemperatur (ca. +22°C) abgekühlt. Anschließend wurde die Lösung in zwei Teile geteilt und folgendermaßen gebrauchsfertig gemacht:

Verdünner I
88 ml Stammlösung
+ 25 ml Eidotter
+ 12 ml Aqua dest.

Verdünner II
88 ml Stammlösung
+ 25 ml Eidotter
+ 12 ml Glyzerin

Abhängig von der Spermienkonzentration des nativen Spermas und der Spermiendichte, die erreicht werden sollte, wurden den Ejakulaten unterschiedliche Verdünnermengen zugegeben. Dabei wurde darauf geachtet, daß unabhängig von den verschiedenen Spermien-

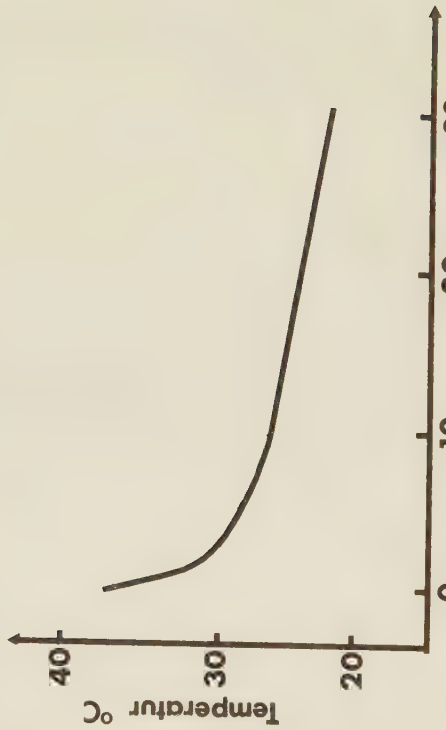

Abb. 1: Temperaturabfall im vorverdünnten Sperma bei Abkühlung auf +22°C

konzentrationen die Glyzerinkonzentration nach der Endverdünnung gleich war. Sie betrug einheitlich 4,8% in allen Proben.

Die auf +22°C abgekühlte, vorverdünnte Spermaprobe wurde in einen Erlenmeyerkolben umgefüllt und der Verdünner I, der dieselbe Temperatur wie das Sperma hatte, bis zur Hälfte des errechneten Endvolumens schnell zugesetzt. Der glyzerinhaltige Verdünner II dagegen wurde ebenfalls bei einer Temperatur von +22°C, mit Hilfe einer Bürette langsam tropfenweise (etwa 2 ml/Minute) zugegeben.

Nach jedem Verdünnungsschritt wurde die Spermiendichte durch Zählen in einer Zählkammer nach TÜRK kontrolliert. Bedingt durch die Schwankungsbreite der Dichtebestimmung sowie die Verdünnung ergaben sich bei der tatsächlichen Endkonzentration gewisse Abweichungen von der theoretisch angestrebten Spermiendichte (Tab. 2).

3.1.2.3. Abfüllen des verdünnten Spermas in Pailletten

Das verdünnte Sperma wurde bei Raumtemperatur (ca. +22°C) in die mittelgroßen, französischen Pailletten mit 0,5 ml Fassungsvermögen abgefüllt, ein Tropfen des Inhalts ausgeschleudert und das offene Ende der Pailletten mit PVC-Pulver verschlossen.

Pro Verdünnungsstufe (8 000, 10 000, 60 000 und 160 000 Spermien/mm³) wurden 25 Pailletten abgefüllt.

3.1.2.4. Abkühlung auf +5°C und Adaptationszeit

Nach dem Verschließen der Pailletten begann der Abkühlungsprozeß. Die Pailletten wurden waagrecht in einem Pappkarton gelagert. Beide Enden der Pailletten ruhten auf Stufen der gegenüberliegen-

Tab. 2: Vergleich von tatsächlichen und angestrebten Spermienkonzentrationen nach der Verdünnung

	angestrebte Spermiendichte Spermien/mm³	tatsächliche Spermiendichte * Spermien/mm³; $\bar{x} \pm s$
1. Versuchsreihe	10 000	7 986 ± 1 864,1
	60 000	55 165 ± 11 644,8
2. Versuchsreihe	10 000	8 046 ± 1 833,1
	60 000	54 470 ± 12 115,7
3. Versuchsreihe	8 000	8 680 ± 1 677,5
	160 000	156 944 ± 35 198,2

* Jede Angabe repräsentiert das Mittel aus 9 Versuchen je Versuchsreihe (3 Bullen, je 3 Ejakulate)

den Wände des Kartons, so daß die Pailletten sich etwa in der Mitte zwischen Boden und Deckel des Kartons befanden. Der allseitig geschlossene Karton wurde in einen Kühlschrank mit einer Innentemperatur von +5°C gestellt. Der gesamte Abkühlprozeß wurde mit einem Thermofühler (Fa. VARIAN Associates, Model G-11A Strip-Chart Recorder) kontrolliert. Dazu wurde die Elektrode des Thermofühlers durch einen ca. 0,1 cm langen Einschnitt in das Innere einer Paillette eingeführt. Die Messung ergab, daß der Pailletteninhalt innerhalb von 30 Minuten von +22°C auf +5°C abgekühlt wurde (Abb. 2).

Abkühl- und Adaptationszeit zusammen betrugen 1, 6 bzw. 24 Stunden. Nach deren Ablauf wurden die Pailletten eingefroren.

3.1.2.5. Tiefgefrier-Schnellmethode nach JONDET (1964)

Nach Ablauf der Adaptationszeiten wurden die Pailletten senkrecht in ein Paillettenkörbchen eingeordnet und so in die Mitte eines Stickstoffbehälters mit einem Fassungsvermögen von 25 Litern gehängt, daß das untere Ende des Paillettenkörbchens mit der Oberfläche des flüssigen Stickstoffes Kontakt hatte. Nach zehn Minuten wurden die Pailletten in den flüssigen Stickstoff eingetaucht.

3.1.2.6. Lagerung und Auftauen

Alle Pailletten wurden nach 10- bis 16tägiger Lagerung aufgetaut. Dazu wurden sie direkt aus dem Stickstoffbehälter in ein Auftaugerät mit elektronisch gesteuerter Temperatur- und Zeitregelung (Fa. MINITOB GmbH, Tiefenbach bei Landshut) verbracht und in 15 Sekunden bei +37°C aufgetaut.

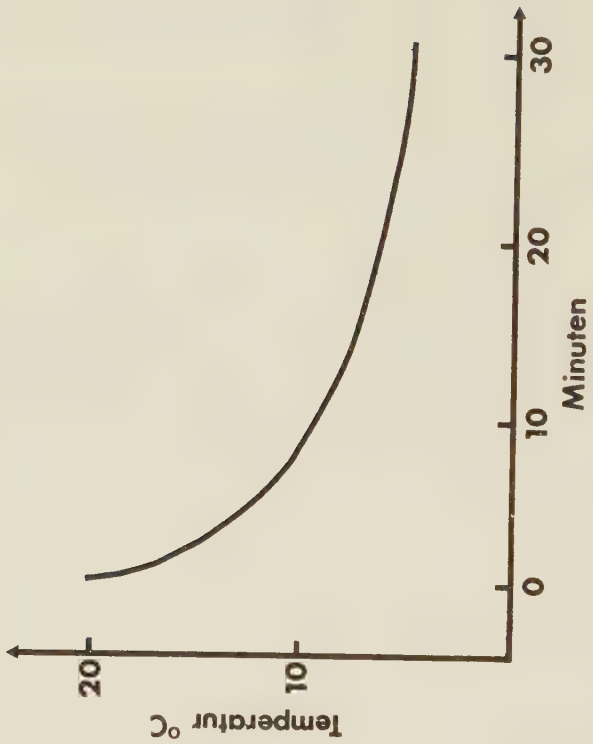

Abb. 2: Temperaturabfall im Paillettteninhalt bei der Abkühlung auf +5°C

3.1.3. Parameter der Untersuchung

Als Kriterium für die Beurteilung der einzelnen Schritte des Tiefgefrierprozesses wurden der Prozentsatz vorwärtsbeweglicher Spermien und der ATP-Gehalt, zum Teil auch der ADP- und AMP-Gehalt der Spermaproben herangezogen. Dies geschah im Nativsperma sowie nach Zugabe von Verdünner I bzw. Verdünner II durch Entnahme einer entsprechenden Menge Sperma aus dem Gesamtmaterial einer Probe. Am Ende der Adaptationszeit sowie nach dem Auftauen wurden zur Gewinnung eines repräsentativen Durchschnittes jeweils 3 Pailletten in ein Gefäß entleert und aus dem gemischten Sperma die zu untersuchende Probe entnommen.

3.1.3.1. Bestimmung der Vorwärtsbewegung

Zur Bestimmung der Vorwärtsbeweglichkeit der Spermien wurde ein kleiner Tropfen (ca. 0,01 ml) natives bzw. verdünntes Sperma auf einen vorgewärmten Objektträger gegeben und mit einem Deckglas (18 x 18 mm) abgedeckt. Die Tropfengröße war so bemessen, daß das Sperma sich gleichmäßig unter dem Deckglas verteilte, ohne an den Rändern hervorzuquellen. Der Objektträger wurde auf den auf +37°C vorgewärmten Heiztisch gelegt und das Präparat mit Phasenkontrastbeleuchtung bei 400-facher Gesamtvergrößerung beurteilt. Es wurde geschätzt, wieviel Prozent der in einem Blickfeld insgesamt sichtbaren Spermien Vorwärtsbewegung zeigten. Als vorwärtsbewegliche Spermien zählten dabei solche, die aktive, schlängelnde, nach vorne gerichtete Bewegungen erkennen ließen. Es wurden drei bis vier Blickfelder an verschiedenen Stellen des Präparates schnell hintereinander durchgemustert. Das Endresultat ergab sich aus dem Durchschnittswert der in den einzelnen Blickfeldern ermittelten Vorwärtsbewegung.

3.1.3.2. Adenosinnucleotidmessung mit dem Biolumineszenz-verfahren

3.1.3.2.1. Vorbereitung einer Spermaprobe

Vor Beginn der Biolumineszenzmessung wurde das Sperma zunächst erhitzt, um eine Inaktivierung der im Seminalplasma enthaltenen ATP-, ADP- und AMP-abbauenden Nucleotidasen zu erreichen. Dabei wurde nach einer von KÄHN (1981a) beschriebenen Methode verfahren. In ein Fiolaxreagenzglas (Fa. SCHOTT, Mainz) mit einer Wanddicke von 0,4 mm und der Abmessung 8 x 70 mm (DIN 12395) wurden 20 µl des nativen bzw. verdünnten Spermas pipettiert und eine Minute lang in kochendes Wasser gehalten. Nach kurzer, etwa zehn Sekunden dauernder Abkühlung in Wasser mit Zimmertemperatur (ca. +22°C) wurde ein Mikroliter der erhitzten Probe für die Adenosinnucleotid-Bestimmung verwendet.

Bei Messungen nach den verschiedenen Adaptationszeiten wurden die verwendeten Reagenzgläser, Fiolaxgläschen und Pipettenspitzen vorher im Kühlschrank gelagert; bei den übrigen Messungen wurden sie bei Zimmertemperatur (ca. +22°C) aufbewahrt.

3.1.3.2.2. Meßgerät und Meßreagenzien

Die Nucleotidbestimmung wurde mit einem Lumineszenzphotometer der Firma LKB-Wallac, Turku, Finnland (Luminometer 1250-001) durchgeführt.

Für die Lumineszenzreaktion fand ein Luciferin-Luciferase-Präparat der Firma LKB Verwendung, das aus der amerikanischen Feuerfliege (Photinus pyralis) gewonnen wird. Die lyophilisierte Substanz mit der Bezeichnung ATP-Monitoring Reagent (AMR) enthält neben L- und D-Luciferin auch Luciferase, Magnesiumazetat und

Rinderserumalbumin. Das Lyophilisat wurde zum Gebrauch in destilliertem Wasser gelöst.

Als ATP-Eichsubstanz diente reines, lyophilisiertes Adenosintriphosphat (ATP-Standard, LKB 1250-122), das mit Aqua dest. auf die Konzentration einer 10^{-5} molaren Lösung eingestellt wurde.

Die zur ADP-Bestimmung eingesetzte Standardlösung wurde aus dem Dinatriumsalz des ADP (Fa. BOEHRINGER, Mannheim) hergestellt.

Als Lösungsmittel wurde ein Tris-H_2SO_4-Puffer mit folgender Zusammensetzung verwendet:

20 mM Trishydroxymethylaminomethan
2 mM EDTA
10 mM $MgSO_4$
12,5 mM KCl
H_2SO_4 ad pH 7,75

Außerdem wurden verwendet:
Pyruvatkinase (Fa. BOEHRINGER, Mannheim; Aktivität 200 U/mg bei +25°C), Myokinase (Fa. BOEHRINGER, Mannheim; Aktivität 360 U/mg bei +25°C) und Phosphoenolpyruvat (Fa. BOEHRINGER, Mannheim), das als kristallisiertes Mononatriumsalz im Tris-H_2SO_4-Puffer gelöst wurde.

3.1.3.2.3. ATP-Bestimmung

Die ATP-Bestimmung wurde wie folgt durchgeführt:
200 µl Luciferin-Luciferase-Reagenz (AMR) wurden zusammen mit 800 µl Tris-H_2SO_4-Puffer in eine Polystyrolküvette pipettiert. Nach Zugabe von 1 µl des erhitzten unverdünnten bzw. verdünnten Spermas (siehe 3.1.3.2.1.) wurde der Gesamtansatz durch Aufsaugen

in eine 1 000 µl Pipette und Zurückgeben in die Küvette durchmischt. Dann wurde die Küvette in die Meßkammer des Photometers verbracht. Durch das Pipettieren und Vermischen erfolgte die erste Messung einer Lichtemission etwa 3 Sekunden nach dem Zusammenbringen der Reaktionspartner. Zunachst wurde die Biolumineszenz der ATP-Standard-Lösung und danach die Biolumineszenz der zu untersuchenden Probe gemessen. Aus den in mV angezeigten Lichtemissionen der ATP-Standardlösung und der zu untersuchenden Probe wurde der ATP-Gehalt in Mol, jeweils auf 10^8 Spermien bezogen, berechnet.

3.1.3.2.4. ADP-Bestimmung

Die ADP-Bestimmung folgte auf die ATP-Messung im gleichen Lumineszenzansatz. Es wurden 200 µl Luciferin-Luciferase-Reagenz (AMR) mit 800 µl Tris-H_2SO_4-Puffer und 10 µl 1 mM Phosphoenolpyruvat in eine Polystyrolküvette pipettiert und 1 Mikroliter des zu untersuchenden Spermas zugegeben. Nach der ATP-Ermittlung erfolgte die Messung von ADP. Durch die Zugabe von 5 µl Pyruvatkinase zu obigem Reaktionsgemisch wurde ADP in ATP verwandelt und damit durch die Biolumineszenz erfaßbar. Nach dem Zusatz der Pyruvatkinase stieg die Lumineszenz weiter an und erreichte nach etwa drei bis fünf Minuten ein erneutes Maximum, das der Summe der ATP- und ADP-bedingten Lumineszenz entsprach. Der ADP-Gehalt der Proben, bezogen auf 10^8 Spermien wurde errechnet, indem man die Lumineszenz einer ADP-Standardlösung mit bekanntem Inhalt mit der Lichtemission der zu untersuchenden Probe verglich (KÄHN, 1981a).

3.1.3.2.5. AMP-Bestimmung

Vor der eigentlichen AMP-Bestimmung mußte jeweils die von KÄHN

(1981a) beschriebene Eigenlumineszenz der Myokinase gemessen werden. Dazu wurden 200 µl Luciferin-Luciferase-Reagenz zusammen mit 800 µl Tris-H_2SO_4-Puffer, 10 µl 1 mM Phosphoenolpyruvat, 5 µl Pyruvatkinase und 5 µl Myokinase in eine Polystyrolküvette pipettiert und gemischt. Die Lumineszenz dieses Reagenzgemisches wurde im Abstand von 5 Minuten gemessen, bis nach etwa 15 bis 30 Minuten ein konstantes Lumineszenzniveau erreicht worden war.

Erst nach Bestimmung der Myokinase-Eigenlumineszenz wurde ein Mikroliter der Spermaprobe hinzugegeben. Durch die Anwesenheit der Enzyme Pyruvatkinase und Myokinase erfolgte eine sofortige Umwandlung des in der Probe enthaltenen AMP und ADP zu ATP. Eine getrennte Ermittlung der einzelnen Adenosinnucleotide war nicht mehr möglich. Die nach Zugabe der Probe registrierte Lichtemission war die Summe aus der Lumineszenz der drei Adenosinnucleotide und der Myokinase-Eigenlumineszenz. Sie wurde ebenfalls im Abstand von ca. fünf Minuten gemessen, bis nach etwa einer halben Stunde ein neues Maximum erreicht war.

Durch die bei der Myokinase zu beobachtenden Besonderheiten war eine zweifache Messung jeder Spermaprobe nötig.

1. Die Messung der ATP-bedingten Lumineszenz und - nach Zugabe der Pyruvatkinase - die Bestimmung der durch ATP und ADP ausgelösten Lumineszenz (siehe 3.1.3.2.4. und 3.1.3.2.5.).

2. Die Messung der Myokinase-Eigenlumineszenz und - nach Zugabe der Probe - die Bestimmung der Summe aus Myokinase-Eigenlumineszenz und ATP-, ADP- und AMP-bedingten Lichtemissionen.

Subtrahiert man von der bei der zweiten Messung bestimmten Lumineszenz die davor gemessene Myokinase-Eigenlumineszenz und die bei der ersten Messung ermittelte ATP + ADP-bedingte Lichtemission, so erhält man die durch AMP ausgelöste Lumineszenz.

Die Berechnung der AMP-Werte erfolgte in der von Kähn (1981a) beschriebenen Weise.

3.1.4. Versuchsaufbau

Im split-sample Verfahren wurden die Auswirkungen verschiedener Modifizierungen einer Tiefgefriermethode auf die Motilität sowie den Adenosinnucleotid-Gehalt von Spermaproben untersucht. Als variable Faktoren innerhalb eines in der Praxis bewährten Tiefgefrierverfahrens (Besamungszentrale Neustadt a.d. Aisch) wurden die Spermiendichte sowie die Adaptationszeit gewählt.

In der ersten Versuchsreihe wurden 9 Ejakulate (jeweils 3 Ejakulate von 3 Bullen) im Rahmen des Tiefgefrierprozesses verarbeitet. Von jedem Ejakulat wurden Proben mit einer Spermiendichte von 10 000 bzw. 60 000 Spermien/mm³ hergestellt. Diese wurden Adaptationszeiten von 1, 6 und 24 Stunden ausgesetzt. Da in dieser Versuchsreihe aus technischen Gründen eine Bestimmung der Parameter nach Zusatz des glyzerinfreien Verdünners nicht möglich war, wurde dies in einer zweiten Versuchsreihe ergänzend durchgeführt. Dazu wurden wiederum 9 Ejakulate zu Proben mit Endkonzentrationen von 10 000 bzw. 60 000 Spermien/mm³ verarbeitet und die Messungen sowohl nach Zugabe des glyzerinfreien (Verdünner I) wie auch des glyzerinhaltigen (Verdünner II) Verdünners durchgeführt. Eine weitere Verarbeitung der Ejakulate wurde in dieser Versuchsreihe nicht vorgenommen.

In einer dritten Versuchsreihe wurden weitere 9 Ejakulate (je 3 von 3 Bullen) zu Spermaproben mit Endkonzentrationen von 8 000 und 160 000 Spermien/mm³ konfektioniert. Die Adaptationszeiten betrugen wieder 1, 6 und 24 Stunden.

Folgende Parameter wurden in den einzelnen Versuchsabschnitten bestimmt:

Versuchsreihe 1 (10 000 bzw. 60 000 Spermien/mm³)
Vorwärtsbeweglichkeit und ATP-Gehalt
- in nativem Sperma
- nach Zugabe des glyzerinhaltigen Verdünners (Verdünner II)
- nach Ablauf der jeweiligen Adaptationszeit
- nach dem Auftauen

Versuchsreihe 2 (10 000 bzw. 60 000 Spermien/mm³)
Vorwärtsbeweglichkeit und ATP-Gehalt
- in nativem Sperma
- nach Zugabe des glyzerinfreien Verdünners (Verdünner I)
- nach Zugabe des glyzerinhaltigen Verdünners (Verdünner II)

Versuchsreihe 3 (8 000 bzw. 160 000 Spermien/mm³)
Vorwärtsbeweglichkeit, ATP- und ADP-Gehalt
- in nativem Sperma
- nach Zugabe des glyzerinfreien Verdünners (Verdünner I)
- nach Zugabe des glyzerinhaltigen Verdünners (Verdünner II)
- nach Ablauf der jeweiligen Adaptationszeit
- nach dem Auftauen

Außerdem wurde in den aufgetauten Proben auch der AMP-Gehalt gemessen.

Die statistische Auswertung wurde nach MUDRA (1958) vorgenommen. Die Differenzen der Mittelwerte wurden mit Hilfe des t-Tests

überprüft; soweit dabei Prozentzahlen vorlagen, wurde eine arcus-sinus Transformation vorgenommen.

3.2. Ergebnisse

3.2.1. Vorwärtsbewegung der Spermien

Nach Zugabe des glyzerinfreien Verdünners I (siehe 3.1.2.2.) war die Vorwärtsbeweglichkeit etwas gesteigert; sie war im Mittel um 5 bis 11% höher als im nativen Sperma, wobei sich die größten Unterschiede bei den Endverdünnungsstufen 8 000 bzw. 160 000 Spermien/mm³ ergaben (Differenz zum Ausgangswert jeweils $P \leqslant 0{,}01$). Der Zusatz des glyzerinhaltigen Verdünners (siehe 3.1.2.2.) hatte eine geringe Verminderung der Spermienmotilität zur Folge, die ebenfalls bei den beiden extremen Verdünnungsstufen am stärksten in Erscheinung trat (Differenz $P \leqslant 0{,}05$ bzw. $P \leqslant 0{,}01$; siehe Tab. 3). In jedem Fall war aber die durchschnittliche Vorwärtsbeweglichkeit nach Zugabe des glyzerinhaltigen Verdünners noch besser als im nativen Sperma.

Auch nach den unterschiedlichen Adaptationszeiten waren deutliche Veränderungen der Motilität nur in den Verdünnungsstufen 8 000 bzw. 160 000 Spermien/mm³ zu beobachten. Nach der 6-stündigen Adaptationszeit wurde bei diesen Spermaproben eine bis zu 6% bessere mittlere Vorwärtsbeweglichkeit als im nativen Sperma ermittelt (Differenz jeweils $P \leqslant 0{,}05$; siehe Tab. 4). In dieser Versuchsreihe ergaben sich auch signifikante Unterschiede zwischen den verschiedenen Adaptationszeiten, wobei die Vorteile der 6-stündigen gegenüber der 24-stündigen Adaptationszeit hervorzuheben sind (Differenz jeweils $P \leqslant 0{,}01$). In der Tendenz sind diese Unterschiede aber auch in den Verdünnungsstufen 10 000 bzw. 60 000 Spermien/mm³ zu beobachten.

Tab. 3: Prozentsatz vorwärtsbeweglicher Spermien im nativen Sperma sowie nach Zugabe von Verdünner I bzw. Verdünner II ($\bar{x} \pm s$; jeder Wert repräsentiert das Mittel aus 9 Ejakulaten)

Ausgangswert: Natives Sperma	Spermien/mm³	Verdünnungsstufe nach Verdünnung I	nach Verdünnung II
70 ± 2,5	10 000	nicht	73 ± 2,6
	60 000	untersucht	71 ± 3,3
67 ± 7,9	10 000	72 ± 6,2	71 ± 5,5
	60 000	72 ± 6,1	70 ± 3,9
63 ± 5,0	8 000	74 ± 4,9**	68 ± 3,6
	160 000	72 ± 6,1**	65 ± 4,6

Differenz zwischen dem Ausgangswert und dem Wert nach der Verdünnung bei einer Versuchsreihe: ** $P \leqslant 0{,}01$.

Differenzen zwischen den Verdünnungen einer Versuchsreihe: — $P \leqslant 0{,}05$; -- $P \leqslant 0{,}01$

Tab. 4: Prozentsatz vorwärtsbeweglicher Spermien im nativen Sperma und nach unterschiedlich langen Adaptationszeiten in Abhängigkeit von der Spermiendichte ($\bar{x} \pm s$; jeder Wert repräsentiert das Mittel aus 9 Ejakulaten)

Ausgangswert: Natives Sperma	Spermien/ mm³	Adaptationszeit		
		1 Stunde	6 Stunden	24 Stunden
70 ± 2,5	10 000	69 ± 3,9	72 ± 5,0	65 ± 10,9
	60 000	68 ± 4,4	70 ± 5,3	64 ± 10,4
63 ± 5,0	8 000	64 ± 8,1	69 ± 6,8*	59 ± 7,8
	160 000	63 ± 6,7	68 ± 5,6*	59 ± 7,8

Differenz zwischen dem Ausgangswert und dem Wert nach Adaptationszeit bei einer Versuchsreihe: * $P \leq 0,05$

Differenzen zwischen den verschiedenen Adaptationszeiten bei einer Versuchsreihe: — $P \leq 0,05$; -- $P \leq 0,01$

Nach dem Tiefgefrieren und Auftauen war der Prozentsatz vorwärtsbeweglicher Spermien mit 2 Ausnahmen (160 000 Spermien/mm³; Adaptationszeit 6 und 24 Stunden) deutlich niedriger als in nativem Sperma (Differenzen jeweils $P \leq 0,01$; siehe Tab. 5). Nur bei den extrem unterschiedlichen Verdünnungsstufen 8 000 bzw. 160 000 Spermien/mm³ war innerhalb einer Versuchsreihe ein Einfluß der Spermiendichte auf die Vorwärtsbeweglichkeit nach 6- bzw. 24-stündiger Adaptationszeit statistisch zu sichern (Differenzen $P \leq 0,01$ bzw. $P \leq 0,05$). Dagegen ergaben sich mit Ausnahme der Endverdünnung von 8 000 Spermien/mm³ vielfältige Unterschiede in der Motilität, die auf den Einfluß der verschieden langen Adaptationszeiten zurückzuführen sind. Dabei zeigte sich einheitlich in allen Verdünnungsstufen, daß eine nur einstündige Adaptationszeit die geringste Vorwärtsbeweglichkeit zur Folge hatte. Bei Verlängerung der Adaptationszeit auf 6 Stunden wurde eine höhere Vorwärtsbeweglichkeit beobachtet. Eine weitere Verlängerung auf 24 Stunden ergab nur bei den Proben mit 8 000 bzw. 160 000 Spermien/mm³ eine noch höhere Vorwärtsbeweglichkeit.

3.2.2. ATP-Gehalt

Der ATP-Gehalt der Proben wurde sowohl durch die Verdünnungen, als auch durch die Adaptationszeit und das Tiefgefrieren beeinflußt. Er zeigte auch eine deutliche Beziehung zur Spermienkonzentration der jeweiligen Probe. Je niedriger diese war, desto höher lag der ATP-Wert.

Nach Zugabe des glyzerinfreien Verdünners war ein Anstieg des durchschnittlichen ATP-Gehaltes zu registrieren. Dieser Anstieg war am geringsten bei der Verdünnungsstufe von 160 000 Spermien/mm³ (Differenz $P > 0,05$), sehr deutlich dagegen bei allen anderen Verdünnungsstufen (Differenzen $P \leq 0,05$ bzw. $P \leq 0,01$; siehe Tab. 6). Durch Zugabe des glyzerinhaltigen Verdünners wurde

Tab. 5: Prozentsatz vorwärtsbeweglicher Spermien nach der Tiefgefrierkonservierung in Abhängigkeit von der Spermiendichte und der Adaptationszeit ($\bar{x} \pm s$; jeder Wert repräsentiert das Mittel aus 9 Ejakulaten)

Ausgangswert: Natives Sperma	Spermien/ mm^3	Nach dem Tiefgefrieren		
		1 Stunde	6 Stunden	24 Stunden
70 ± 2,5	10 000	45 ± 9,2**	56 ± 10,5**	54 ± 9,9**
	60 000	51 ± 9,9**	60 ± 4,3**	54 ± 11,0**
63 ± 5,0	8 000	29 ± 18,3**	35 ± 15,8**	42 ± 19,4**
	160 000	40 ± 13,9**	55 ± 15,9[b]	59 ± 11,7[a]

Differenz zwischen dem Ausgangswert und dem Wert nach dem Tiefgefrieren bei einer Versuchsreihe: ** $P \leq 0,01$

Differenzen zwischen den verschiedenen Adaptationszeiten einer Versuchsreihe: — $P \leq 0,05$; -- $P \leq 0,01$

Differenzen zwischen den auf verschiedene Dichten verdünnten Spermaproben bei einer Versuchsreihe: [a] $P \leq 0,05$; [b] $P \leq 0,01$

Tab. 6: ATP-Gehalt (10^{-9}mol/10^8 Spermien) im nativen Sperma sowie nach Zugabe von Verdünner I bzw. Verdünner II ($\bar{x} \pm s$; jeder Wert repräsentiert das Mittel aus 9 Ejakulaten)

Ausgangswert: Natives Sperma	Spermien/ mm³	Verdünnungsstufe	
		nach Verdünnung I	nach Verdünnung II
20,3 ± 6,38	10 000	nicht	34,9 ± 17,66*
	60 000	untersucht	23,9 ± 11,26
15,3 ± 3,19	10 000	26,0 ± 10,0**	20,8 ± 5,68*
	60 000	22,6 ± 7,19*	16,7 ± 5,88
15,1 ± 4,12	8 000	28,7 ± 13,76*	28,2 ± 9,32**
	160 000	17,9 ± 3,20[a]	15,8 ± 3,40[b]

Differenzen zwischen dem Ausgangswert und den Werten nach den Verdünnungen bei einer Versuchsreihe: * $P \leq 0,05$; ** $P \leq 0,01$

Differenzen zwischen den auf verschiedene Dichten verdünnten Spermaproben einer Versuchsreihe: [a] $P \leq 0,05$; [b] $P \leq 0,01$

dieser Anstieg teilweise wieder reduziert. Auch bei dem Parameter ATP-Gehalt konnten Unterschiede zwischen Verdünnungsstufen innerhalb einer Versuchsreihe nur bei den Extremen 8 000 bzw. 160 000 Spermien/mm³ verifiziert werden (Differenzen nach Verdünnung I bzw. II: $P \leq 0,05$ bzw. $P \leq 0,01$).

Nach der Adaptationszeit war der ATP-Gehalt der Spermaproben nur in einem Fall gegenüber dem Wert in nativem Sperma deutlich erniedrigt (160 000 Spermien/mm³, 24 Stunden Adaptationszeit; $P \leq 0,05$; siehe Tab. 7), in mehreren Fällen sogar bis zu 4,1% erhöht. Ein signifikanter Einfluß der verschiedenen Adaptationszeiten auf den ATP-Gehalt war nur bei einer Endverdünnung von 160 000 Spermien/mm³ festzustellen, wobei eine 6-stündige Adaptationszeit einer 1- bzw. 24-stündigen überlegen war (Differenz jeweils $P \leq 0,05$).

Bei der ATP-Messung nach dem Tiefgefrieren und Auftauen wurden bei allen Verdünnungsstufen mittlere ATP-Gehalte bestimmt, die niedriger lagen als die im nativen Sperma (Tab. 8). Der weitaus geringste Abfall des ATP-Wertes war in der höchsten Verdünnungsstufe (8 000 Spermien/mm³) festzustellen. In allen anderen Verdünnungsstufen ergaben sich deutliche Unterschiede zum Ausgangswert (Differenz jeweils $P \leq 0,01$; 160 000 Spermien/mm³ und 24 Stunden $P \leq 0,05$). Ein Einfluß verschieden langer Adaptationszeiten konnte nur bei den Verdünnungsstufen 10 000 bzw. 60 000 Spermien/mm³ zwischen der 1- und der 6-stündigen Adaptation statistisch gesichert werden (Differenzen $P \leq 0,05$ bzw. $P \leq 0,01$).

3.2.3. Vergleich der Vorwärtsbewegung mit dem ATP-Gehalt

Besonders bei der Darstellung der ATP-Werte nach dem Auftauen wird deutlich, daß vor allem die Spermienkonzentrationen den ATP-Gehalt entscheidend beeinflussen. Damit sind einem Vergleich

Tab. 7: ATP-Gehalt (10^{-9}mol/10^{8} Spermien) im nativen Sperma und nach unterschiedlich langen Adaptationszeiten in Abhängigkeit von der Spermiendichte ($\bar{x} \pm s$; jeder Wert repräsentiert das Mittel aus 9 Ejakulaten)

Ausgangswert: natives Sperma	Spermien/ mm³	Adaptationszeit		
		1 Stunde	6 Stunden	24 Stunden
20,3 ± 6,38	10 000	19,0 ± 3,80	21,0 ± 9,48	21,6 ± 8,10
	60 000	17,3 ± 9,12	17,6 ± 4,57	18,0 ± 6,03
15,1 ± 4,12	8 000	19,2 ± 7,52	19,2 ± 7,90	16,1 ± 10,66
	160 000	11,5 ± 3,63	16,2 ± 5,91	9,5 ± 4,31*

Differenz zwischen dem Ausgangswert und dem Wert nach Adaptationszeit bei einer Versuchsreihe: * $P \leq 0,05$

Differenz zwischen den verschiedenen Adaptationszeiten bei einer Versuchsreihe: — $P \leq 0,05$

Tab. 8: ATP-Gehalt (10^{-9}mol/10^{8} Spermien) in Spermaproben nach der Tiefgefrierkonservierung in Abhängigkeit von Spermiendichte und Adaptationszeit ($\bar{x} \pm s$; jeder Wert repräsentiert das Mittel aus 9 Ejakulaten)

Ausgangswert: natives Sperma	Spermien/ mm³	Nach dem Tiefgefrieren		
		1 Stunde	6 Stunden	24 Stunden
20,3 ± 6,38	10 000	9,2 ± 2,77**	12,9 ± 2,65**	11,3 ± 1,93**
	60 000	7,5 ± 2,97**	11,6 ± 2,96**	9,4 ± 2,05**
15,1 ± 4,12	8 000	12,8 ± 5,16	12,7 ± 7,30	13,5 ± 6,88
	160 000	8,4 ± 3,04**	8,3 ± 2,24**	11,1 ± 4,17*

Differenzen zwischen dem Ausgangswert und den Werten nach verschiedenen Adaptationszeiten bei einer Versuchsreihe: * $P \leqslant 0,05$
** $P \leqslant 0,01$

Differenzen zwischen den verschiedenen Adaptationszeiten bei einer Versuchsreihe: — $P \leqslant 0,05$; -- $P \leqslant 0,01$

zwischen den verschiedenen Verdünnungsstufen, erst recht aber zwischen den einzelnen Versuchsreihen Grenzen gesetzt. Für die Beurteilung des ATP-Gehaltes sind deswegen vorwiegend die relativen Veränderungen innerhalb einer split-sample Versuchsreihe heranzuziehen. Dies wird auch deutlich bei einem Vergleich der Vorwärtsbewegung mit dem jeweiligen ATP-Gehalt in den Spermaproben.

Die relativen Veränderungen der Motilität bzw. des ATP-Gehaltes innerhalb einer Verdünnungsstufe im Laufe des Tiefgefrierprozesses stimmten jeweils gut überein. Als Beispiel seien die Ergebnisse bei den Proben mit einer Endkonzentration von 8 000 Spermien/mm³ dargestellt (Abb. 3). Sowohl die Vorwärtsbewegung als auch der ATP-Gehalt waren nach Zugabe des glyzerinfreien Verdünners I (siehe 3.1.2.2.) höher als im nativen Sperma und sanken nach der Endverdünnung etwas ab. Während der Motilitätsanstieg nur einen geringen Prozentsatz betrug, erhöhte sich der ATP-Gehalt auf nahezu das Doppelte des Wertes im nativen Sperma. Nach dem Auftauen waren bei allen Spermaproben sowohl die Vorwärtsbewegung als auch der ATP-Gehalt auf Werte reduziert, die niedriger als die des nativen Spermas lagen.

3.2.4. ADP-Gehalt

In den Proben mit 8 000 und 160 000 Spermien/mm³ wurde parallel zum ATP-Gehalt auch der ADP-Gehalt nach den einzelnen Phasen des Tiefgefrierprozesses bestimmt.

Bei der niedrigeren Spermienkonzentration erhöhte sich der durchschnittliche ADP-Gehalt durch den Verdünnungsvorgang auf mehr als das Doppelte (23,2 nmol/10^8 Spermien) im Vergleich zum nativen Sperma ($P \leq 0{,}05$; siehe Tab. 9). Während der Adaptationszeit sank er in 1 Stunde auf 17,5 nmol, zeigte nach 6 Stunden ein Maximum

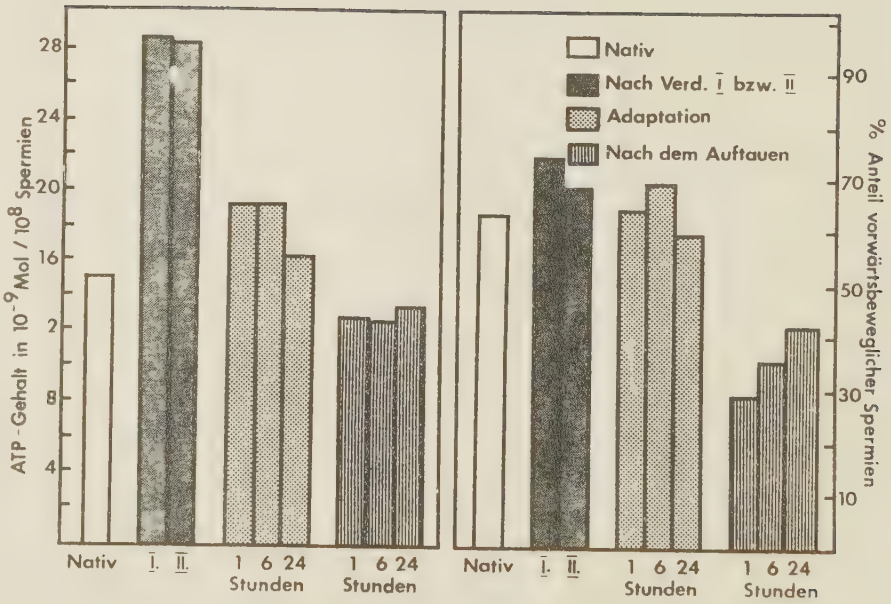

Abb. 3: ATP-Gehalt und prozentualer Anteil vorwärtsbeweglicher Spermien bei Proben mit 8 000 Spermien/mm^3

Tab. 9: ADP-Gehalt (10^{-9}mol/10^{8} Spermien) im nativen Sperma sowie während und nach der Tiefgefrierkonservierung in Abhängigkeit von Spermiendichte und Adaptationszeit ($\bar{x} \pm s$; jeder Wert repräsentiert das Mittel aus 9 Ejakulaten)

Natives Sperma		10,4 ± 6,29	
Spermien/mm³		8 000	160 000
nach Verdünnung I		20,3 ± 18,04	11,3 ± 4,70
nach Verdünnung II		23,2 ± 13,79*	13,2 ± 6,38
nach der Adaptationszeit	1 Stunde	17,5 ± 9.53	9,6 ± 3,04
	6 Stunden	22,5 ± 10,89*	16,4 ± 9,13
	24 Stunden	16,8 ± 7,94	9,7 ± 4,11
nach dem Tiefgefrieren	1 Stunde	15,4 ± 4,36	6,9 ± 2,16
	6 Stunden	16,0 ± 6,93	7,2 ± 1,54
	24 Stunden	15,8 ± 9,07	8,5 ± 1,63

Differenzen zum Ausgangswert: * $P \leqslant 0,05$

von 22,5 nmol (Differenz zum Ausgangswert $P \leqslant 0,05$) und war nach 24 Stunden wieder auf 16,8 nmol abgesunken. Nach dem Auftauen lagen die durchschnittlichen ADP-Werte zwischen 15,4 und 16,0 nmol; ein Einfluß der verschiedenen Adaptationszeiten war nicht mehr zu erkennen.

Bei der höheren Spermienkonzentration war der ADP-Gehalt nach der Zugabe der Verdünner im Mittel von 10,4 nmol/10^8 Spermien im nativen Sperma nur auf 13,2 nmol gestiegen. Im weiteren Versuchsablauf zeigten die ADP-Werte in ihren relativen Veränderungen zwar eine ähnliche Tendenz wie die der stark verdünnten Proben, die absoluten Werte sind aber auch hier so verschieden, daß ein nicht versuchsbedingter Einfluß, wie in Kapitel 3.2.3. bereits erläutert, nicht ausgeschlossen werden kann.

3.2.5. Verhältnis von ATP- zu ADP-Gehalt

Im nativen Sperma wurde ein durchschnittliches ATP : ADP-Verhältnis von 1 : 0,69 ermittelt, d.h. es war jeweils mehr ATP als ADP in den Spermaproben enthalten. Die Verdünnung bewirkte eine geringfügige Verschiebung dieses Verhältnisses zugunsten von ADP (Tab. 10). Während bei einer Endverdünnung auf 8 000 Spermien/mm³ im weiteren Verlauf des Tiefgefrierprozesses diese Verschiebung im ATP : ADP-Verhältnis noch deutlicher wurde, blieb es bei den Proben mit 160 000 Spermien/mm³ nahezu gleich.

Bei nativem Sperma besteht eine positive Korrelation zwischen ATP- und ADP-Gehalt. Bei den Proben mit 8 000 Spermien/mm³ konnte eine hohe Korrelation zwischen den beiden Nucleotiden nach jedem Verdünnungsschritt und nach dem Auftauen festgestellt werden. Bei den Proben mit 160 000 Spermien/mm³ waren das Adenosintriphosphat und das Adenosindiphosphat nach dem Auftauen eng korreliert (Tab. 11).

Tab. 10: Verhältnis von ATP : ADP in nativem Sperma sowie während und nach der Tiefgefrierkonservierung in Abhängigkeit von Spermiendichte und Adaptationszeit

Natives Sperma		1 : 0,69	
Spermien/mm³		8 000	160 000
nach Verdünnung I		1 : 0,71	1 : 0,63
nach Verdünnung II		1 : 0,82	1 : 0,83
nach der Adaptationszeit	1 Stunde	1 : 0,91	1 : 0,83
	6 Stunden	1 : 1,17	1 : 1,01
	24 Stunden	1 : 1,04	1 : 1,02
nach dem Tiefgefrieren	1 Stunde	1 : 1,20	1 : 0,81
	6 Stunden	1 : 1,25	1 : 0,87
	24 Stunden	1 : 1,17	1 : 0,76

Tab. 11: Korrelation zwischen ATP- und ADP-Gehalt im nativen Sperma sowie während und nach der Tiefgefrierkonservierung bei den Proben mit 8 000 bzw. 160 000 Spermien/mm³ (jeweils n = 9)

Natives Sperma		r = 0,73*	
Spermien/mm³		8 000	160 000
nach Verdünnung I		r = 0,95**	r = 0,43
nach Verdünnung II		r = 0,69*	r = 0,61
nach der Adaptationszeit	1 Stunde	r = 0,67*	r = 0,37
	6 Stunden	r = 0,44	r = 0,56
	24 Stunden	r = 0,78*	r = 0,58
nach dem Tiefgefrieren	1 Stunde	r = 0,95**	r = 0,96**
	6 Stunden	r = 0,99**	r = 0,94**
	24 Stunden	r = 0,88**	r = 0,97**

* $P \leqslant 0,05$; ** $P \leqslant 0,01$;

3.2.6. AMP-Gehalt

Zusätzlich zum ATP- und ADP-Gehalt wurde bei den Proben mit 8 000 bzw. 160 000 Spermien/mm³ nach dem Auftauen auch der AMP-Gehalt gemessen.

In stark verdünnten Spermaproben (8 000 Spermien/mm³) lag der durchschnittliche AMP-Gehalt zwischen 46,6 und 52,5 nmol/10^8 Spermien (Tab. 12). In den Proben mit 160 000 Spermien/mm³ dagegen wurden nur Werte von 16,1 bis 18,4 nmol/10^8 Spermien gemessen (Differenz jeweils $P \leqslant 0{,}01$). Die Länge der Adaptationszeit hatte keinen erkennbaren Einfluß auf den AMP-Gehalt.

3.2.7. Verhältnis von ATP- zu AMP-Gehalt

Das Verhältnis von ATP zu AMP in aufgetauten Spermaproben wurde deutlich von der Spermienkonzentration beeinflußt (Tab. 13). Bei einer Spermiendichte von 8 000 Spermien/mm³ lag das ATP : AMP-Verhältnis zwischen 1 : 4,11 und 1 : 3,44, bei 160 000 Spermien/mm³ zwischen 1 : 2,17 und 1 : 1,44. In beiden Verdünnungsstufen verschob sich das ATP : AMP-Verhältnis mit zunehmender Dauer der Adaptationszeit zugunsten von ATP.

3.2.8. "Adenylate energy charge" (AEC)

Aus den ATP-, ADP- und AMP-Gehalten wurde der von ATKINSON und WALTON (1967) definierte "Adenylate energy charge" (AEC)-Wert berechnet.

Der AEC-Wert von nativem Sperma, der unabhängig von den anderen Versuchsreihen bei 3 Bullenejakulaten bestimmt wurde, betrug

Tab. 12: AMP-Gehalte (10^{-9}mol/10^{8} Spermien) in Spermaproben nach der Tiefgefrierkonservierung in Abhängigkeit von Spermiendichte und Adaptationszeit ($\bar{x} \pm s$; jeder Wert repräsentiert das Mittel aus 9 Ejakulaten)

Spermien/ mm³	Adaptationszeit		
	1 Stunde	6 Stunden	24 Stunden
8 000	52,5 ± 17,15 |	48,9 ± 16,74 |	46,6 ± 18,87 |
160 000	18,4 ± 5,83 |	17,1 ± 4,80 |	16,1 ± 4,43 |

\| Differenz: $P \leqslant 0{,}01$

Tab. 13: Verhältnis von ATP : AMP in Spermaproben nach der Tiefgefrierkonservierung in Abhängigkeit von Spermiendichte und Adaptationszeit

Spermien/ mm³	Adaptationszeit		
	1 Stunde	6 Stunden	24 Stunden
8 000	1 : 4,11	1 : 3,83	1 : 3,44
160 000	1 : 2,17	1 : 2,05	1 : 1,44

durchschnittlich 0,63 (Tab. 14).

Nach dem Auftauen tiefgefrorener Spermaproben wurde grundsätzlich ein niedrigerer AEC-Wert beobachtet. Im Mittel lag er bei den Proben mit 8 000 Spermien/mm³ zwischen 0,25 und 0,28, bei denen mit 160 000 Spermien/mm³ zwischen 0,35 und 0,42. Bei der zuerst genannten Verdünnungsstufe betrug der AEC-Wert somit etwa 40%, bei der zuletzt genannten etwa 60% des in nativem Bullensperma bestimmten Wertes. Nach 24 Stunden Adaptationszeit war bei den Proben mit 160 000 Spermien/mm³ ein signifikant höherer AEC-Wert ($P \leqslant 0,01$) als nach 1- oder 6-stündiger Adaptation zu registrieren. Bei den Proben mit 8 000 Spermien/mm³ war eine ähnliche Tendenz festzustellen, die aber statistisch nicht abgesichert werden konnte (Tab. 15).

Tab. 14: ATP-, ADP- und AMP-Gehalt (10^{-9}mol/10^{8} Spermien) sowie "Adenylate energy charge" (AEC) nativer Spermaproben

Ejakulat	Spermien-dichte x 10^{6}/mm^{3}	ATP-Gehalt	ADP-Gehalt	AMP-Gehalt	AEC
A	2,3	9,54	5,80	4,57	0,62
B	1,1	11,78	7,97	4,26	0,65
C	1,8	10,18	6,36	4,26	0,64
$\bar{x}$	1,7	10,50	6,71	4,36	0,63

Tab. 15: ATP-, ADP- und AMP-Gehalt (10^{-9}mol/10^{8} Spermien), sowie "Adenylate energy charge" (AEC) nach der Tiefgefrierkonservierung in Abhängigkeit von Spermiendichte und Adaptationszeit ($\bar{x} \pm s$; jeder Wert repräsentiert das Mittel aus 9 Ejakulaten)

Spermien/ mm³	Adaptations-zeit	ATP	ADP	AMP	AEC
8 000	1 Stunde	12,77±5,16	15,38±4,36	52,48±17,15	0,25±0,062
	6 Stunden	12,75±7,30	16,00±6,93	48,86±16,74	0,25±0,067
	24 Stunden	13,53±6,88	15,81±9,07	46,62±18,87	0,28±0,120
160 000	1 Stunde	8,44±3,04	6,86±2,16	18,37± 5,83	0,35±0,037
	6 Stunden	8,32±2,24	7,23±1,54	17,11± 4,80	0,36±0,045
	24 Stunden	11,15±4,17	8,50±1,63	16,08± 4,43	0,42±0,045*

* Differenz zu 1 Stunde und 6 Stunden $P \leqslant 0,01$ (t-Test)

4. Diskussion

Seit längerer Zeit wird versucht, den ATP-Gehalt von Spermien als zusätzlichen Parameter zur Beurteilung von Spermaproben einzusetzen (BRACKETT und WILLIAMS, 1967; BROOKS, 1970a). Verwirklicht werden konnte dieser Gedanke jedoch erst, nachdem es durch das Biolumineszenzverfahren möglich wurde, den ATP-Gehalt im Sperma rasch und relativ einfach zu bestimmen (PFETSCH, 1979; KÄHN, 1981a, b). Mit dieser Methode konnte unter verschiedenen Versuchsbedingungen eine gute Korrelation zwischen ATP-Gehalt und Motilität gefunden werden. Deshalb lag es nahe, die Brauchbarkeit dieser ATP-Bestimmung für praktische Fragestellungen zu prüfen. Als Modell bot sich die Tiefgefrierkonservierung von Bullensperma aus mehreren Gründen an. Einmal dürfte sie im Rahmen der künstlichen Besamung die in der Praxis wichtigste andrologische Fragestellung sein, zum zweiten wirken in den verschiedenen Abschnitten des Einfriervorganges jeweils spezifische Noxen auf die Spermaprobe ein, deren Auswirkungen sowohl unmittelbar danach als auch in ihrer Gesamtheit nach dem Einfriervorgang durch Messungen ermittelt und verglichen werden können. Schließlich wird drittens bisher zur Kontrolle des Verfahrens fast ausschließlich die Motilitätsschätzung eingesetzt und dies nicht nur, weil diese Methode einfach und billig ist, sondern auch, weil es keine andere Methode gibt, die sowohl bei nativen wie bei verdünnten bzw. wieder aufgetauten Spermaproben angewendet werden kann. Gerade die letzte Oberlegung sprach auch für den Versuch, die Eignung der ATP-Messung als Parameter für die Beurteilung der Tiefgefrierkonservierung von Bullensperma abzuklären.

Folgende Fragestellungen wurden untersucht:

1. Bietet der Parameter "ATP-Gehalt der Spermien" Informationen, die mit der bisher üblichen Motilitätsschätzung vergleichbar sind?

2. Kann dieser Parameter Auswirkungen auf die Spermien, die durch Modifizierung von Einzelschritten des Tiefgefrierverfahrens entstehen, deutlich machen? Ist dies eventuell bereits während des Tiefgefrierprozesses nach Einwirkung der jeweiligen "Noxe" (z.B. Verdünnung, Adaptation) möglich?

3. Kann durch das Einbeziehen von ADP und AMP die Aussagemöglichkeit verbessert werden oder ist es sogar notwendig, diese beiden Adenosinnucleotide zu bestimmen, um sichere Angaben machen zu können?

Zur Klärung dieser Fragen wurde ein in der Praxis der Besamungszentrale Neustadt a.d. Aisch bewährtes Tiefgefrierkonservierungsverfahren eingesetzt. Dabei wurden zwei Faktoren variiert, nämlich die Endverdünnung, d.h. die Dichte der Samenproben sowie die Dauer der Adaptationszeit. In dem Verfahren der Besamungszentrale Neustadt a.d. Aisch werden die Ejakulate auf durchschnittlich 60 000 Spermien/mm³ verdünnt und Adaptationszeiten von 6 - 17 Stunden eingehalten. In den eigenen Versuchen wurden über diese Werte hinausgehende Variationen der Dichte (8 000 bis 160 000 Spermien/mm³) bzw. der Adaptationszeit (1, 6 und 24 Stunden) gewählt, um eine ausreichende Variationsbreite für die Beurteilung der Brauchbarkeit des Parameters "ATP-Gehalt" zur Verfügung zu haben.

Mit der allseits üblichen Bestimmung der Motilität der Spermien, d.h. dem prozentualen Anteil vorwärtsbeweglicher Samenzellen, war keine eindeutige Aussage möglich. Sowohl nach der Verdünnung als auch nach der Adaptationsphase sind keine deutlichen Unterschiede zu erkennen. Selbst nach dem Auftauvorgang lieferten alle Versuchsreihen, von einer Ausnahme abgesehen (8 000 Spermien/mm³), Endwerte, die auch in der Praxis vertretbar wären. Trotzdem sind zwei Tendenzen erkennbar. Eine nur einstündige Adaptationszeit

hatte in allen Versuchsreihen den geringsten Prozentsatz vorwärtsbeweglicher Spermien zur Folge. Unterschiedliche Endverdünnungen müssen schon sehr extrem sein, wie es hier bei 8 000 und 160 000 Spermien/mm³ der Fall war, um Auswirkungen auf den Parameter Motilität erfassen zu können.

Die ATP-Werte in den verschiedenen Phasen des Tiefgefrierprozesses weisen ein gleichsinniges Verhalten wie die jeweils geschätzte Vorwärtsbeweglichkeit auf, d.h., sie sind ebenfalls nach der Verdünnung höher und nach dem Auftauen tiefer. Die Unterschiede, die auf die verschieden langen Adaptationszeiten zurückzuführen sind, können damit, ähnlich wie auch durch die Motilitätsschätzung, nur tendenziell sichtbar gemacht werden. In der Versuchsreihe mit 10 000 bzw. 60 000 Spermien/mm³ hat die einstündige Adaptationszeit die niedrigste Motilität und den geringsten ATP-Wert zur Folge, während in der Versuchsreihe mit 8 000 bzw. 160 000 Spermien/mm³ der ATP-Wert ähnlich wie die Motilitätsschätzung die leichten Vorteile der 24-stündigen Adaptationszeit belegen kann. Dabei darf aber nicht übersehen werden, daß die relativen Beziehungen zwischen den ATP-Werten nach den einzelnen Tiefgefrierabschnitten und dem Ausgangswert zum Teil gegensätzliche Interpretationen wie die Motilitätsschätzungen nahelegen. So wurden in der Versuchsreihe mit 8 000 Spermien/mm³ nach dem Auftauen höhere ATP-Gehalte gemessen als bei allen anderen Versuchsreihen. Gerade bei diesen Proben aber war die Vorwärtsbeweglichkeit am niedrigsten. Es scheint daher, daß der Parameter ATP-Gehalt Unterschiede im split-sample Verfahren, wie hier durch die Adaptationszeit bedingt, relativ gut wiedergeben kann. Zwischen Versuchsreihen, die durch eine starke Variation der Spermiendichte gekennzeichnet waren, ergeben sich dagegen kaum Anhaltspunkte für eine sinnvolle Interpretation.

Den Einfluß der Spermienkonzentration zeigen auch sehr deutlich die Ergebnisse nach der Verdünnung des nativen Spermas. Den zum

Teil fast doppelt so hohen ATP-Werten entspricht in fast allen Fällen ein nur geringer Anstieg der geschätzten Vorwärtsbewegung. Die Ursachen dieses starken Anstieges des ATP-Gehaltes in verdünntem Sperma könnten darin liegen, daß in diesem Fall weitaus weniger Spermien in der Meßkammer sind und so die entstehende Lumineszenz frei abstrahlen kann. Allerdings muß dabei auch berücksichtigt werden, daß bei diesem Meßverfahren nur 1 µl Sperma in 1 000 µl Meßreagenzien eingebracht und deswegen in jedem Fall eine starke Verdünnung erzielt wird. Der ATP-Anstieg könnte aber auch dadurch entstehen, daß bei der Verdünnung des nativen Spermas die im Seminalplasma aktiven ATP-asen in ihrer Wirksamkeit entsprechend gemindert werden und dadurch zumindest kurzfristig die ATP-Synthese überwiegt und tatsächlich ein höherer ATP-Gehalt vorliegt. Diese Oberlegung berührt einen zweiten Problemkreis, der bei der Interpretation dieser Untersuchungen berücksichtigt werden muß. Der ATP-Gehalt in einer Spermaprobe stellt kein Energiereservoir dar wie etwa die Fruktose, die je nach Stoffwechsellage mehr oder weniger langsam abgebaut wird. Vielmehr ist hier eine Kinetik durch ständigen Ab- und Aufbau gegeben, weshalb auch die Zwischenprodukte ADP und AMP eventuell mit zur Interpretation herangezogen werden müssen.

Die Methodik der ADP- und AMP-Bestimmung mit Hilfe einer Biolumineszenzreaktion im Sperma ist bekannt (KÄHN, 1981a, b). In der vorliegenden Arbeit wurde in den Versuchsreihen mit 8 000 bzw. 160 000 Spermien/mm³ zusätzlich zum ATP- auch der ADP-Gehalt bestimmt. Nach der ersten Verdünnung stieg parallel zum ATP-Gehalt auch ADP an, so daß das ATP : ADP-Verhältnis nahezu gleich blieb (Tab. 10). Dies spricht dafür, daß die Verdünnung durch Aktivierung des Stoffwechsels den gesamten Energiehaushalt der Spermien erhöht und nicht nur selektiv den ATP-Gehalt steigert. Den Einfluß der Adaptationszeit kann das ATP : ADP-Verhältnis weder unmittelbar danach noch an aufgetauten Spermaproben deutlich machen. Dagegen treten nach dem Auftauen wieder die Auswirkungen

der unterschiedlichen Spermiendichten zu Tage. In diesem Fall aber zeigt sich gegenüber dem ATP-Wert allein bereits ein Vorteil der kombinierten Messung. Geht man davon aus, daß der Stoffwechsel und damit auch die Motilität umso intensiver ist, je mehr ATP im Verhältnis zu ADP vorhanden ist, so spiegelt dieses Verhältnis hier die Unterschiede in der Vorwärtsbeweglichkeit zwischen beiden Versuchsreihen wider (8 000 Spermien/mm³: Motilität 29 bis 42%; ATP : ADP entspricht 1 : 1,17 bis 1 : 1,25. 160 000 Spermien/mm³: Motilität 40 bis 59%; ATP : ADP entspricht 1 : 0,76 bis 1 : 0,87). Die Unterschiede zwischen den Adaptationszeiten, die der ATP-Wert allein in der Tendenz richtig wiedergab, können aber mit diesem Parameter nicht mehr erkannt werden. Durch das Eliminieren der Absolutwerte beim Verhältnis ATP : ADP geht offenbar ein Teil der Informationen verloren. Es scheinen jedoch methodisch bedingte Nachteile, wie zum Beispiel die Einflüsse verschiedener Spermiendichten, ausgeglichen zu werden.

Bezieht man schließlich auch den AMP-Wert in diese Oberlegungen mit ein, so ist die Berechnung des "Adenylate energy charge" (AEC)-Wertes möglich. Der AEC-Wert wurde in der Versuchsreihe mit 8 000 und 160 000 Spermien/mm³ ermittelt. Die Ergebnisse deuten darauf hin, daß durch die Verbindung von ATP, ADP und AMP zum AEC-Wert die Schwierigkeit der Bewertung absoluter Werte überwunden werden kann. Gegenüber dem ATP : ADP-Verhältnis scheint sich außerdem der oben erwähnte Informationsverlust durch die zusätzliche AMP-Bestimmung zumindest auszugleichen. Wie aus den Tabellen 4 bzw. 13 zu entnehmen ist, besteht eine gute Obereinstimmung der geschätzten Motilität mit den AEC-Werten, wobei der Einfluß der Spermiendichte korrigiert ist und andererseits die Auswirkungen der unterschiedlichen Adaptationszeiten in der Tendenz richtig erkannt werden können.

Die Nachteile der Erfassung des AEC-Wertes für praktische Fragestellungen liegen in dem erheblichen Aufwand an Zeit und Mate-

rial, den die Messungen von ATP, ADP und AMP erfordern. Ein routinemäßiger Einsatz dieses Parameters zur Oberwachung eines Tiefgefrierverfahrens dürfte deshalb kaum in Frage kommen. Jedoch wäre es möglich, den AEC-Wert bei prinzipiellen Fragen, wie z.B. der Änderung eines Tiefgefrierverfahrens, als objektiven Parameter zu benutzen.

Die Schwierigkeit der Interpretation der ATP-Werte ist schließlich noch einem dritten Problemkreis zuzuordnen, über dessen Gewichtigkeit bisher nur Vermutungen angestellt werden können.

Als Maßstab für die Wertigkeit der Adenosinnucleotid-Messungen dient jeweils nur der geschätzte Prozentsatz vorwärtsbeweglicher Spermien. Neben der rein subjektiven Erfassung dieses Parameters, die an sich schon einen Unsicherheitsfaktor darstellt, kommt erschwerend hinzu, daß ein wesentlicher Bestandteil der Motilität, nämlich die Geschwindigkeit der Spermien, überhaupt nicht erfaßt wird. Gerade beim sog. Verdünnungseffekt liegt die Vermutung nahe, daß der stark erhöhte ATP-Wert von verdünntem gegenüber nativem Sperma auf eine wesentlich intensivere Vorwärtsbewegung des Einzelspermiums zurückgeht, ohne daß der Prozentsatz vorwärtsbeweglicher Spermien sich entscheidend ändert. Es ist deshalb für die Beurteilung der physiologischen Bedeutung des Parameters "ATP-Gehalt" anzustreben, die Spermiengeschwindigkeit zur Interpretation mit heranzuziehen.

SCHLUSSFOLGERUNG

Die Bestimmung des ATP-Gehaltes im Rahmen der Tiefgefrierkonservierung von Bullensperma kann gegenüber der bisher üblichen Motilitätsschätzung nur bedingt Hinweise geben, die zur Optimierung dieses Verfahrens dienen könnten. Diese Einschränkung ergibt sich

aus der Beobachtung, daß der ATP-Wert einer vorerst nicht näher zu erklärenden Beeinflussung durch die Spermienkonzentration unterliegt. Deshalb ist die ATP-Bestimmung bei der Oberprüfung des Tiefgefrierverfahrens nur für Fragestellungen geeignet, die nach der split-sample Methode ohne Abänderung der Spermienkonzentration untersucht werden können. Außerdem scheint der ATP-Wert allein den Energiehaushalt der Spermien nicht unter allen Bedingungen widerspiegeln zu können. Eine zusätzliche Information ergibt die gleichzeitige Erfassung von ATP, ADP und AMP und der daraus zu berechnende AEC-Wert, wodurch die Beurteilung der Absolutwerte ergänzt werden kann. Der in diesen Versuchen ermittelte AEC-Wert von aufgetauten Spermaproben wies eine gute Beziehung zur geschätzten Motilität auf.

5. Zusammenfassung

Es wurde überprüft, ob die ATP-, ADP- und AMP-Bestimmung in praktischen, andrologischen Fragestellungen zusätzlich zur bisher üblichen Motilitätsschätzung für die Beurteilung der Stoffwechselaktivität einer Spermaprobe eingesetzt werden kann. Als Modell diente das Verfahren der Tiefgefrierkonservierung von Rindersperma.

Um eine entsprechende Variationsbreite zur Beurteilung zur Verfügung zu haben, wurden innerhalb eines erprobten Tiefgefrierverfahrens 2 Faktoren variiert. Im split-sample Test wurden von jedem Ejakulat Samenportionen mit 10 000 bzw. 60 000 Spermien/mm³ oder 8 000 bzw. 160 000 Spermien/mm³ sowie Adaptationszeiten von 1, 6 oder 24 Stunden verwendet. In allen Abschnitten des Verfahrens wurde der ATP-Gehalt bestimmt sowie die Motilität geschätzt. Zusätzlich wurde in einer Versuchsreihe auch der ADP- Wert und nach dem Auftauen der AMP-Wert gemessen. Die ATP-, ADP- und AMP-Bestimmung erfolgte mit der Biolumineszenzmethode.

Mit dem ATP-Wert allein konnten Unterschiede zwischen verschiedenen Adaptationszeiten belegt werden. Die Messung von ATP, ADP und AMP und die Berechnung des AEC (Adenylate energy charge)-Wertes von tiefgefrorenen Spermaproben nach dem Auftauen ermöglichte auch die Beurteilung von Samenproben unterschiedlicher Spermienkonzentrationen und den Vergleich von Ergebnissen aus verschiedenen Versuchsansätzen.

Die ATP-Bestimmung mit Hilfe der Biolumineszenz erwies sich als geeignet zur Beurteilung von Samenproben bei praktischen Fragestellungen - hier am Modell der Tiefgefrierkonservierung überprüft - vorausgesetzt, daß eine split-sample Versuchsanordnung und Proben gleicher Spermienkonzentration verwendet werden.

6. Summary

It was tested, if the evaluation of the ATP, ADP and AMP content in the semen is applicable as an additional method for the conventional estimation of sperm motility used in breeding soundness examinations.

In order to have adequate variations for evaluation purposes, two factors within the same deepfreeze preservation procedure were varied. Each ejaculate was divided into a portion with 10 000 and 60 000 or 8 000 and 160 000 cells/mm³ with an equilibration time of 1, 6 or 24 hours. The ATP content of the semen was determined and estimation of sperm motility was performed during each section of the procedure. Further, the ADP level in the semen and the AMP content following thawing of the semen was determined in one test series. The bioluminescence method was employed to determine the semen ATP, ADP and AMP concentrations.

Differences between various equilibration times could be determined with the ATP value. The measurements of ATP, ADP and AMP and the computation of the AEC (Adenylate energy charge) value of deepfrozen and thawed sperm samples made it also possible to evaluate sperm samples of different sperm concentrations and different experimental series.

The determination of ATP by means of bioluminescence proved to be suitable for evaluation of sperm samples when tested during deepfreeze conservation. For this purpose, it is necessary to apply a split-sample technique with equal sperm concentrations.

7. Literaturverzeichnis

ATKINSON, D.E. and G.M. WALTON (1967): Adenosintriphosphate conservation in metabolic regulation.
J. Biol. chem. 242, 3239-3241

BLACKSHAW, A.W., G.W. SALISBURY and N.L. VAN DEMARK (1957): Factors influencing metabolic activity of bull spermatozoa. I. 37, 21, and 5°C.
J. Dairy Sci. 40, 1093-1098

BRACKETT, B.G. and W.L. WILLIAMS (1967): ATP content of spermatozoa, semen and seminal plasma.
Proc. Soc. Exp. Biol. 125, 1133-1136

BROOKS, D.E. (1970a): Acid soluble phosporus compounds in mammalian semen.
Biochem. J. 118, 851-857

BROOKS, D.E. (1970b): Observation in the content of ATP and ADP in bull spermatozoa using the firefly luciferase system.
J. Reprod. Fert. 23, 525-528

BROOKS, D.E. (1971): Nucleotides in spermatozoa.
J. Reprod. Fert. 25, 302-303

EASLEY, G.T., D.T. MAYER and R. BOGART (1942): Influence of diluters, rate of cooling and storage temperatures on survival of bull sperm.
Am. J. Vet. Res. 3, 358-363

EIBL, K., W. LEIDL, R. HAHN und H.F. ZODER (1964): Zur Rationalisierung des Einfrierprozesses von Bullensperma.
Berl. Münch. tierärztl. Wschr. 23, 453-454

ENNEN, B.D., W.E. BERNDTSON, R.G. MORTIMER and B.W. PICKETT (1976): Effect of processing procedures on motility of bovine spermatozoa frozen in 0,25-ml straws.
J. Anim. Sci. 43, 651-656

FOOTE, R.H., L.C. GRAY, J.C. YOUNG and M.O. DUNN (1960): Fertility of bull semen stored up to four days at 5°C in 20% egg yolk extender.
J. Dairy Sci. 43, 1330-1334

FOULKES, J.A. and B.J. MacDONALD (1979): The relationship between ATP content and motility of bovine spermatozoa.
Theriogenology 11, 313-319

FOULKES, J.A. and D.L. STEWART (1977): Artificial insemination of cattle using varying numbers of spermatozoa.
Vet. Rec. 101, 205

GARBERS, D.L., N.L. FIRST and H.A. LARDY (1973): The stimulation of bovine epididymal sperm metabolism by cyclic nucleotide phosphodiesterase inhibitors.
Biol. Reprod. 8, 589-598

GIBBONS, B.H. and I.R. GIBBONS (1979): Relationship between the latent adenosine triphosphatase state of dynein 1 and its ability to recombine functionally with KCl-extracted sea urchin sperm flagella.
J. Biol. Chem. 254, 197-201

HAHN, R. (1966): Zum Verdünnungsgrad des Bullenspermas in TG-N_2-Verfahren.
Tierärztl. Umschau 21, 164-171

HAYDN, R. (1968): Die Temperatur bei der Adaptation vor der Tiefgefrierung von Bullenspermien.
Vet. Med. Diss., München

HOLM-HANSEN, O. and D. KARL (1978): Biomass and adenylate energy charge determination in microbial cell extracts and environmental samples methods in enzymology. Methods in enzymology. Ed. DeLUCA, M.A. 57, 73-85, Acad. Press, New York, San Francisco, London

HOLT, A.F. (1953): The storage of bull semen at low temperature. Vet. Rec. 65, 561-562

HOSKINS, D.D. (1972): Adenine nucleotide mediation of fructolysis and motility in bovine epididymal spermatozoa. J. Biol. Chem. 248, 1135-1140

IRITANI, A. (1980): Problems of freezing spermatozoa of different spezies. Proc. IX. Int. Congr. Anim. Reprod. Artif. Insem. 1: 115-132, Madrid

JONDET, R. (1964): Congélation rapide du sperme de taureau conditionné en Paillettes. Proc. V. Int. Congr. Anim. Reprod. Artif. Insem. 4: 463-468, Trient

JONDET, R. (1972a): Survival rate and fertilizing ability of frozen bull spermatozoa following 8 and 1 minute exposure to glycerol. Proc. VII. Int. Congr. Anim. Reprod. Artif. Insem. 2: 1371-1372, München

JONDET, R. (1972b): Contribution to the assessment of the minimal number of frozen spermatozoa necessary to obtain fertilization in the cow. Proc. VII. Int. Congr. Anim. Reprod. Artif. Insem. 2: 1443-1448, München

JONDET, R. (1980): Contribution a l'amelioration de la technologie du sperme de taureau.
Thèse Sci. Biol., Université Rennes

KÄHN, W. (1981a): Zur ATP-, ADP- und AMP-Bestimmung mit dem Biolumineszenzverfahren im Sperma einiger Haustiere und des Menschen.
Vet. Med. Diss., München

KÄHN, W. (1981b): Zum ADP- und AMP-Nachweis im Sperma mit dem Biolumineszenzverfahren.
Zuchthyg. 2, 76

KÄHN, W., J. PFETSCH und W.LEIDL (-): ATP-, ADP- und AMP-Gehalt von Spermien einiger Haustiere und des Menschen und von Bullenspermien während der Tiefgefrierkonservierung.
Zuchthyg., im Druck

KATZ, D.F. and J.W. OVERSTREET (1981): Sperm motility assessment by videomicrography.
Fert. Steril. 35, 188-193

LEIDL, W. (1980): Neue Aspekte aus der Spermatologie.
30. Int. Fachtagung "Fortpflanzung und Besamung", Wels, Österreich

LEIDL, W. und M. ROSSE (1956): Der Einfluß der Tiefkühlung auf den Sauerstoffverbrauch von Bullensperma.
Dt. tierärztl. Wschr., Beil. Fortpflanzung, Zuchthygiene und Haustierbesamung 6, 117-119

MACHIN, D.E. (1958): Wave propagation along flagella.
J. Exp. Biol. 35, 796

MUDRA, A. (1958): Statistische Methoden für landwirtschaftliche Versuche.
Paul Parey Verlag, Berlin, Hamburg

NEVO, A.C. and R. RIKMENSPOEL (1969): Diffusion of ATP in sperm flagella.
J. Theor. Biol. 26, 11-18

NEWTON, A.A. and LORD F.R.S. ROTHSCHILD (1961): Energy-rich phosphate compounds in bull semen: comparison of their metabolism with anaerobic heat production and impedance change frequency.
Proc. Roy. Soc. B/155, 183-194

O'DELL, G. and V. HURST (1956): Glycerol equilibration time on the effect of the freezing of bovine spermatozoa in egg yolk-sodium citrate and skimmilk semen extenders.
J. Dairy Sci. 39, 1156-1160

PFETSCH, J. (1979): Zur ATP-Bestimmung im Sperma einiger Haustierarten mit dem Biolumineszenzverfahren.
Vet. Med. Diss., München

PICKETT, B.W., R.C. HALL, J.J. LUCAS and E.W. GIBSON (1964): Influence of sperm number on fertility of frozen bovine semen.
J. Dairy Sci. 47, 916-919

POLGE, C. and K.F. JAKOBSEN (1959): Techniques for freezing bull semen.
Vet. Rec. 71, 928-932

POLGE, C. and L.E.A. ROWSON (1952): Fertilizing capacity of bull spermatozoa after freezing at -79°C.
Nature 169, 626-627

PRINZEN, R. (1977): ATP-Bestimmung mit einer Schnellmethode an frischen und tiefgefrorenen Bullenspermien.
Zuchthyg. 12, 105-108

SALISBURY, G.W. and N.L. VAN DEMARK (1961): Physiology of reproduction and artificial insemination of cattle.
W.H. FREEMAN & Co., San Francisco, London

WHITE, A., P. HANDLER, E.L. SMITH and D. STETTEN (1954): Principles of biochemistry.
Mc Graw-Hill Book Co., New York

WIGGIN, H.B. and J.O. ALMQUIST (1975a): Effect of glycerol equilibration time and thawing rate upon acrosomal maintenance and motility of bull spermatozoa frozen in plastic straws.
J. Anim. Sci. 35, 302-305

WIGGIN, H.B. and J.O. ALMQUIST (1975b): Combinations of glycerol percent, glycerol equilibration time, and thawing rate upon freezability of bull spermatozoa in plastic straws.
J. Dairy Sci. 58, 416-419

Herrn Professor Dr. W. Leidl möchte ich an dieser Stelle sehr herzlich für die Überlassung des Themas und die jederzeit gewährte Unterstützung danken.

Bei allen Mitarbeitern des Lehrstuhls, insbesondere aber bei Frau R. Haitchi, Frau Dr. G. Buck, Frl. A. Kreuchauf, Herrn Dr. J. Braun und Herrn Dr. W. Kähn möchte ich mich für viele Anregungen und Ratschläge im Laufe dieser Arbeit bedanken.

Dem Besamungsverein Neustadt a.d. Aisch e.V. danke ich für die Möglichkeit, das dort praktizierte Tiefgefrierverfahren kennenlernen und verwenden zu dürfen.

Mein Dank gilt auch dem Deutschen Akademischen Austauschdienst für die Finanzierung meines Aufenthaltes in der Bundesrepublik Deutschland.

LEBENSLAUF

Am 16.7.1951	wurde ich in Fontibon/Kolumbien als achtes Kind von Guillermo Vélez und seiner Frau Maria Teresa de Vélez, geb. Cuevas, geboren.
Von 1959 bis 1964	Besuch der Grundschule in Bogota
Von 1965 bis 1970	Besuch der Oberschule in Bogota
Von 1971 bis 1976	Studium der Tiermedizin an der Universidad Nacional de Colombia, das ich mit dem Staatsexamen abschloß. Im selben Jahr wurde mir aufgrund meiner Arbeit über den Gammaglobulinspiegel bei Zeburindern und Hybriden die Doktorwürde zuerkannt.
Von 1976 bis 1979	Assistenztierarzt bei der Vereinigung der Zebu-Rinderzüchter. Aufgabengebiet: Zuchthygiene und Tierhaltung.
Seit 1979	war ich in der Gynäkologischen und Ambulatorischen Tierklinik der Universität München mit der Anfertigung der vorliegenden Dissertation beschäftigt.